

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-012584

(43)Date of publication of application : 16.01.1996

(51)Int.Cl.

A61K 35/70  
A61K 35/70  
A61K 38/55  
C12N 9/99  
C12P 1/02  
// (C12P 1/02  
C12R 1:645 )

(21)Application number : 06-144394

(71)Applicant : YAKULT HONSHA CO LTD

(22)Date of filing : 27.06.1994

(72)Inventor : CHATANI TAKAKO  
SAWADA HARUJI  
WATANABE TSUNEICHI  
YOKOKURA TERUO

**(54) ALPHA-AMYLASE ACTIVITY INHIBITOR, ITS PRODUCTION AND PREVENTIVE/THERAPEUTIC AGENT FOR DIABETES**

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject new enzyme activity inhibitor having excellent stability, safety and effectiveness, useful as a preventive/therapeutic agent for diabetics by cultivating a fungus belonging to the genus *Brachysporiella*, capable of producing an  $\alpha$ -amylase activity inhibitor.

CONSTITUTION: A fungus [e.g. *Brachysporiella*. sp C-525 (FERM P-14,375)] belonging to the genus *Brachysporiella* capable of producing an  $\alpha$ -amylase activity inhibitor is cultured and a product is collected from the culture solution to give the objective new  $\alpha$ -amylase activity inhibitor which inhibits  $\alpha$ -amylase derived from swine pancreas and human saliva, but does not inhibit  $\alpha$ -amylase derived from barley, a bacterium belonging to the genus *Bacillus* and a fungus belonging to the genus *Aspergillus*, has about 19,500-21,000 molecular weight by gel filtration method and about 20,000 molecular weight by SDS-PAGE, is stable at 4° C at pH2-10 for 48 hours and at pH7 at 100° C for 3 hours, is water-soluble and an aqueous solution of a salt, subjected to salting-out with 60% ammonium sulfate and is precipitated to give the objective new  $\alpha$ -amylase activity inhibitor.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-12584

(43) 公開日 平成8年(1996)1月16日

(51) IntCl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/70	A E D	7431-4C		
	A D P	7431-4C		
38/55				
C 1 2 N 9/99				

A 6 1 K 37/ 64

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-144394

(22) 出願日 平成6年(1994)6月27日

(71) 出願人 000006884

株式会社ヤクルト本社

東京都港区東新橋1丁目1番19号

(72) 発明者 茶谷 貴子

東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤクルト本社内

(72) 発明者 澤田 治司

東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤクルト本社内

(72) 発明者 渡辺 常一

東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤクルト本社内

(74) 代理人 弁理士 有賀 三幸 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質、その製造法及びこれを含有する糖尿病の予防・治療剤

(57) 【要約】

【構成】 次の理化学的性質を有する $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質及びこれを含有する糖尿病予防・治療剤。

(1) ブタ膵臓由来の $\alpha$ -アミラーゼ及びヒト唾液由来のアミラーゼを阻害し、オオムギ由来の $\alpha$ -アミラーゼ、バチルス属微生物由来の $\alpha$ -アミラーゼ及びアスペルギルス属微生物由来の $\alpha$ -アミラーゼを阻害しない。

(2) MW=19,500~21,000 (ゲル濾過)。(3) 4℃においてpH2~10の範囲で18時間安定である。(4) pH7及び温度100℃において3時間安定である。(5) プロティナーゼにより失活する。

(6) 水に可溶である。

【効果】 安定、安全かつ有効性に優れる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記の理化学的性質を有する  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質。

## (1) 作用

ブタ膵臓由来の  $\alpha$ -アミラーゼ及びヒト唾液由来の  $\alpha$ -アミラーゼを阻害し、オオムギ由来の  $\alpha$ -アミラーゼ、バチルス属微生物由来の  $\alpha$ -アミラーゼ及びアスペルギルス属微生物由来の  $\alpha$ -アミラーゼを阻害しない。 $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害は非拮抗的である。

## (2) 分子量

ゲル濾過法で約 19,500~21,000、SDS-PAGE で約 20,000。

## (3) pH 安定性

4℃において、pH 2~10 の範囲で 48 時間安定。

## (4) 温度安定性

pH 7、100℃で 3 時間安定。

## (5) 溶解性

水及び塩類水溶液に可溶。硫酸 60% で塩析されて沈殿する。

## (6) プロティナーゼ K により失活する。

## (7) 陰イオン交換体に吸着する。

【請求項 2】 請求項 1 記載の  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質を有効成分として含有する糖尿病の予防・治療剤。

【請求項 3】 ブラキスポリエラ (*Brachysporiella*) 属に属し、 $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質を生産し得る微生物を培養し、得られた培養液から  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質を採取することを特徴とする請求項 1 記載の  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質の製造法。

【請求項 4】  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質を生産し得る微生物が、工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM P-14375 として寄託された微生物である請求項 3 記載の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、安定性、安全性及び有効性の点で優れた  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質、その製造法、それを生産する微生物及び該  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質を含有する糖尿病予防・治療剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 アミラーゼは、デンプン、グリコールを加水分解する酵素であり、動物の唾液、膵液中等に含まれる酵素であり、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ及び糖化型アミラーゼに大別される。 $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質は、 $\alpha$ -アミラーゼの活性を阻害し、体内への糖質の供給を抑制する。従って過剰なエネルギーの供給を抑制するので糖尿病や肥満症等の予防、治療に有効である。

【0003】  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質に関する研究は古くから行われ、数多くの  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質が開発されてきた。主にそれらは、ペプチド系物質と

オリゴ糖系物質に分類される。

【0004】 微生物由来のペプチド系  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質としては、ストレプトマイセス属より村尾らが見出した Haim (*Agric. Biol. Chem.*, 44 (7), 1679-1681, 1980)、Paim (*Agric. Biol. Chem.*, 47 (2), 453-454, 1983)、T-76 (特公平 4-2600 号)、N-61 (特開平 2-67299 号)、ストレプトマイセス属より後藤らが見出した X-2 (特公昭 54-11395 号)、ストレプトマイセス属より宮川らが見出した I-1001 (特開昭 61-74587 号)、ストレプトマイセス属より原田らが見出した AI-B (特開昭 57-2684 号)、クラドスポリウム属より遠藤らが見出した トマスタチン (特開昭 57-146586 号) などが挙げられる。

【0005】 微生物由来のオリゴ糖系  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質として、ストレプトマイセス属より村尾らが見出した アミロスタチン A (特開昭 50-123891 号)、ストレプトマイセス属より横瀬らが見出した トレストアチン (Hoffmann-La Roche & Co., AG; 1979; Ger. Offen. DE 2905649; Brit. priority February 14, 1978) などが挙げられる。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 このように、現在まで多くの  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質が開発されてきたが、そのほとんどが放線菌であるストレプトマイセス属の微生物より得られたものであり、安定性、安全性、有効性等の点で問題があり、未だ実用の段階まで至っていないのが実情である。従って、本発明の目的は、上記問題点がなく、医薬等として用いることができる  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質を提供することにある。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 斯かる実情に鑑み本発明者らは、新規な  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質を見出すべく土壌より分離した多数の糸状菌についてスクリーニングを行った結果、ブラキスポリエラ (*Brachysporiella*) 属の代謝産物中に、安定性、安全性及び有効性に優れ、医薬として有用な新規  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質を見出し本発明を完成した。

【0008】 すなわち、本発明は下記の理化学的性質を有する  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質、この製造法及びこれを有効成分とする糖尿病の予防・治療剤を提供するものである。

## 【0009】 (1) 作用

ブタ膵臓由来の  $\alpha$ -アミラーゼ及びヒト唾液由来の  $\alpha$ -アミラーゼを阻害し、オオムギ由来の  $\alpha$ -アミラーゼ、バチルス属微生物由来の  $\alpha$ -アミラーゼ及びアスペルギルス属微生物由来の  $\alpha$ -アミラーゼを阻害しない。 $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害は非拮抗的である。

## (2) 分子量

ゲル濾過法で約19,500~21,000、SDS-PAGEで約20,000。

## (3) pH安定性

4℃において、pH2~10の範囲で48時間安定。

## (4) 温度安定性

pH7、100℃で3時間安定。

## (5) 溶解性

水及び塩類水溶液に可溶。硫酸60%で塩析されて沈澱する。

## (6) プロティナーゼKにより失活する。

## (7) 陰イオン交換体に吸着する。

【0010】本発明の $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質は、例えば、ブラキスポリエラ (*Brachysporiella*) 属に属し、 $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質を生産し得る微生物を培養し、得られた培養液から $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質を採取することによって製造される。

【0011】ここで用いる $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質を生産し得る微生物としては、ブラキスポリエラ属に属し、該阻害物質を生産するものであれば特に限定されないが、本発明者らが、土壤中より発見したブラキスポリエラ ガヤナ C-525 (*Brachysporiella gayana* C-525) 株を用いることが好ましい。この菌株の菌学的性質を以下に示す。

【0012】(1) 分離：高尾山の土壌より分離した。

(2) 生育状態：麦芽寒天培地では発育は速くなく、広がらない。ピロード状で硬い集落。暗灰緑色から暗灰色。裏面はほとんど黒色。分生子形成不良。

【0013】(3) 顕微鏡的性質

分生子柄：寄主上で高さ140~280 $\mu$ mに達し、単独、直立、あるいは幾分屈曲、厚膜、頂端近くで分生子形成分岐を出す、幅は基部で8~10 $\mu$ m、先端は3~4 $\mu$ m、暗赤褐色、先端淡色である。

分生子形成細胞：フラスコ型、9~11 $\times$ 4~6 $\mu$ m、分生子形成に従って連鎖するか、あるいは離脱分生子に付着する。

【0014】分生子：アレウロ型分生子、分生子柄先端あるいは側枝の分生子形成細胞端に生じ、倒卵形~洋なし形、下端は截断状、暗褐色、4細胞が多い、上端細胞も大きく、下端細胞は時として崩壊、24~28(30) $\times$ 11~14 $\mu$ m、分生子形成後、形成細胞は切断面から伸長し次の分生子をつくる、分生子の大きさは20~38 $\times$ 12~20 $\mu$ m、27~40 $\times$ 16~21 $\mu$ mと幾分差がある。

## (4) 最適生育条件

温度：24℃~28℃

pH：6.0~6.5

## (5) 生育の範囲

温度：15℃~30℃

pH：5.0~7.5

## (6) その他の特徴

胞子の色は濃緑色

【0015】以上の菌学的性質を基準として菌類図鑑(椿啓介、宇田川俊一編、講談社刊)を用いて検索したところ、本菌株は寒天培地上の生育菌系の色調、性状及び分生子柄、分生子形成細胞並びに分生子の形状から判断してブラキスポリエラ ガヤナ種の新規菌株であると判断し、ブラキスポリエラ エスピー (*Brachysporiella* sp.) C-525と命名し、工業技術院生命工学工業技術研究所に微生物受託番号FERM-P14375として寄託した。

【0016】本発明における $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質は*Brachysporiella*属に属する $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質生産菌を一般的手法によって培養することにより、培地中に生成蓄積させることができる。培地には、ポリペプトン、酵母エキスなどの窒素源、グルコース等の炭素源、及びリン酸1カリウム、リン酸2カリウム、硫酸マグネシウム等の無機塩を加えたものを使用することが好ましい。また培養温度は15~30℃、好ましくは24~28℃、pHは5~7.5、特に6~6.5とすることが好ましい。

【0017】培養液からの本発明 $\alpha$ -アミラーゼ阻害物質の採取方法としては、濾過、遠心分離等による菌体除去、限外濾過、硫酸処理、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動法、凍結乾燥法、透析法等が挙げられる。これらの方法を適当に組み合わせることにより該物質を単離することができる。

【0018】かくして得られる本発明の $\alpha$ -アミラーゼ阻害物質の理化学的性質及びその試験方法を詳細に示せば、次の通りである。

【0019】なお、以下 $\alpha$ -アミラーゼ活性及び $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性は次の測定法により行った。

【0020】 $\alpha$ -アミラーゼ活性測定方法：40 $\mu$ lの精製水、60 $\mu$ lのバッファー(0.2Mトリス マレイン酸一塩酸バッファー；pH7、5mM  $\text{CaCl}_2$ )、約0.2単位(1単位とは、25℃、pH6.9の条件下で可溶性デンプンから1分間に1 $\mu$ Mのマルトースを遊離する活性)のブタ膵臓由来の $\alpha$ -アミラーゼ(worthington biochemical corporation製)を含有する酵素溶液100 $\mu$ lを混合し、37℃にて5分間予備加熱。次いで、この溶液に4%可溶性デンプン溶液(0.2Mトリス マレイン酸一塩酸バッファー；pH7、5mM  $\text{CaCl}_2$ )200 $\mu$ lを添加し、37℃にて12分間反応させるこの反応液に0.5N塩酸を500 $\mu$ l添加し、振盪することにより $\alpha$ -アミラーゼ反応を停止させる。この反応液50 $\mu$ lを採取し、精製水950 $\mu$ l、ルゴール(Lugol)液(0.0016Nヨウ素含有)500 $\mu$ lを添加し、振盪する。この溶液の655nmにおける吸光度をCとす

る。別にブランクとして上記酵素溶液の代わりに精製水を用いて反応液を調製し、同様の操作を行う。これによって得られた吸光度をBとする。

【0021】このようにして得られた吸光度C及びBから $\alpha$ -アミラーゼ活性Aが次式により算出される。ここでAの計算値が0.5となるときの $\alpha$ -アミラーゼ活性を1単位とする。

$$【0022】A = (B - C) / B$$

【0023】従って、阻害物質が存在しない場合の $\alpha$ -アミラーゼ活性をA<sub>0</sub>とするとA<sub>0</sub>は上記 $\alpha$ -アミラーゼ活性測定と同様にして測定され、得られた吸光度をT<sub>0</sub>とすると、次式を用いて算出される。

$$【0024】A_0 = (B - T_0) / B$$

【0025】 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性測定法：上記 $\alpha$ -アミラーゼ活性測定方法における反応系中の精製水40 $\mu$ lの代わりに阻害物質溶液40 $\mu$ lを用いて反応液を調製し、同様の操作を行う。この操作によって得られた吸光度をT<sub>i</sub>とする。阻害物質が存在する場合の $\alpha$ -アミラーゼ活性をA<sub>i</sub>とするとA<sub>i</sub>は次式により算出される。

$$【0026】A_i = (B - T_i) / B$$

【0027】阻害物質が存在するときの阻害率をI(%)とすると、Iは次式により算出される。

$$【0028】I = ((A_0 - A_i) \times 100) / A_0$$

【0029】上記ブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼ活性の2単位の50%を阻害する $\alpha$ -アミラーゼ阻害物質の量を1阻害単位とすると、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害物質の阻害活性は次式により算出される。

$$【0030】阻害活性 = (A_0 / 1.0) \times (I / 50) \times \text{阻害物質の希釈倍数}$$

【0031】〔理化学的性質〕

(T) 分子量

(1-1) ゲル濾過による分子量

セファクリルS-100 (ファルマシア社製) を用いたゲル濾過によると、分子量は19,500~21,000であった。

(1-2) SDS-PAGE (20% アクリルアミドゲル使用) による分子量は約20,000であった。

【0032】(2) タンパク質分解酵素の影響  
該活性阻害物質に非特異的にタンパクを分解する酵素、プロティナーゼK (メルク社) を作用させ、37℃にて60分間反応した。プロティナーゼKを失活させたのち、所定の $\alpha$ -アミラーゼ活性測定法により阻害活性の有無を確認した結果、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性は消失した。よって、該 $\alpha$ -アミラーゼ阻害物質はタンパク質であると考えられる。

【0033】(3) 溶媒に対する可溶性  
水及び塩類水溶液に可溶である。

(4) 硫安による塩析  
硫安60%で塩析されて沈殿する。

【0034】(5) 陰イオン交換体への吸着

Q-セファロース (ファルマシア社製) 等に吸着する。

【0035】(6) pH安定性

4℃において、pH2から10の範囲で18時間安定である。すなわち、100%の阻害率を示す培養上清をpH2から10のリン酸バッファーに溶解し、4℃にて1晩放置後、0.2Mトリス マレイン酸バッファー (pH7) に置換、所定の $\alpha$ -アミラーゼ活性測定法にて阻害活性を測定した結果、上記pH範囲において阻害活性はほぼ100%残存し、広いpH範囲における安定性を確認した (図1)。

【0036】(7) 熱に対する安定性

pH7、100℃において3時間安定である。すなわち、本発明物質を100℃の沸騰浴中にて30、60、90、120、180分間加熱した後、所定の $\alpha$ -アミラーゼ活性測定法にて阻害活性を測定した結果、上記条件においては阻害活性はほぼ100%残存し、熱に対する安定性を確認した (図2)。

【0037】(8) 作用

ブタ膵臓由来の $\alpha$ -アミラーゼの代わりに種々の $\alpha$ -アミラーゼを用い、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性測定法に準じて測定を行った。反応条件はそれぞれの $\alpha$ -アミラーゼの反応に適した条件とした結果、ブタ膵臓由来の $\alpha$ -アミラーゼ、ヒト唾液由来の $\alpha$ -アミラーゼを阻害し、オオムギ由来の $\alpha$ -アミラーゼ、アスペルギルス由来の $\alpha$ -アミラーゼ、バチルス由来の $\alpha$ -アミラーゼに対しては阻害しなかった。

【0038】(9)  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害型式  
非拮抗的阻害を示した (図3)。

【0039】以上の理化学的性質より、本発明の $\alpha$ -アミラーゼ阻害物質は従来知られている微生物起源の $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質及び植物起源の $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質とは全く異なる新規なものである。例えば前記T-76 (特公平4-2600号) の分子量は8,000であり、N-61 (特開平2-67299号) はヒト唾液由来 $\alpha$ -アミラーゼをほとんど阻害せず、更にHaim、Paim、X-2及びI-1001は分子量が本発明物質に比べいずれも半分以下であり、本発明物質とは明らかに異なる物質である。またLD50値は2g/kg以上であり実質上急性毒性は認められない。

【0040】上記のように本発明 $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質はヒト唾液由来 $\alpha$ -アミラーゼを強く阻害するので、体内への過剰の糖質の供給を抑制するので、糖尿病や肥満症の予防・治療剤として有用である。

【0041】 $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質を糖尿病の予防・治療薬として用いるには1日100mg/kg程度を経口投与するのが好ましい。また投与形態としては、錠剤、顆粒剤、カプセル剤等の経口投与用製剤が好ましい。更にデンプン等を含む食品中に混合して投与する形態としてもよい。

【0042】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが本発明は、これらに限定されるものではない。なお「%」は「重量%」を示す。

【0043】実施例 1

グルコース 2%、大豆粉 0.5%、ポリペプトン 1%、酵母エキス 0.5%、リン酸 1 カリウム 0.1%、リン酸 2 カリウム 0.2%、硫酸マグネシウム 0.05% を含む培地 (pH 7) 7 L を 10 L 容ジャーファーマンターに入れ、121℃にて 15 分滅菌し、冷却後、種菌 (500 ml 坂口プラスコに上記培地 100 ml を入れ、滅菌後、*Brachysporiella gayana* C-525 株を無菌的に接種し、28℃にて 3 日間振盪培養したもの) 300 ml を植菌し、28℃にて 1 週間 0.5 vvm の通気速度にて通気攪拌培養を行った。培養終了後、培養液を濾過及び遠心分離を行い、菌体を取り除き、培養上清 6450 ml を得た。本溶液の IC<sub>50</sub> は 85  $\mu$ g (タンパク) / ml 反応液、全阻害活性は 57,018 単位であった。

【0044】実施例 2

培養上清を限外濾過 (排除限界分子量 10,000) にかけて、濃縮液を得た。更に、濃縮液を硫化アンモニウム 50% 飽和で塩析を行い、遠心分離により、その上清を得た。上清は、精製水及びバッファーにより 1 晩透析 (排除限界分子量 6,000~8,000) を行った。更に、本溶液を凍結乾燥し、バッファーに溶解後、遠心分離を行い、上清を得た。

【0045】実施例 3

上記濃縮液を強陰イオン交換樹脂 Q-セファロース Fast Flow (ファルマシア社製) に吸着させ、NaCl (0~1 M) を含むバッファー (50 mM リン酸バッファー pH 8.5) でステップワイズ溶出した。結果、0.4 M NaCl を含むバッファーによる溶出画分に阻害活性が濃縮された。活性画分は精製水及びバッファーにより透析 (排除限界分子量 6,000~8,000) し、脱塩を行った。本操作によって得られた該活性タンパク量は 98 mg、IC<sub>50</sub> 値は 7.5  $\mu$ g (タンパク) / ml 反応液、全阻害活性は 23,259 単位であっ

た。

【0046】実施例 4

直径 2.5 cm、長さ 100 cm のカラムに充填したゲル濾過樹脂セファクリル S-100 (ベッド体積約 450 ml) に上記活性画分を吸着させ、0.2 M の NaCl を含む 200 mM リン酸バッファー (pH 8.5) で展開した。結果、分子量約 19,500 から 21,000 に相当するフラクションに阻害活性が確認された。本操作によって得られた該活性タンパク量は 21 mg で、その IC<sub>50</sub> 値は 1.85  $\mu$ g (タンパク) / ml 反応液であった。また、全阻害活性は 7,001 単位であった。

【0047】実施例 5

シアノジェンブロマイド活性化 セファロース 4 B にリガンドとしてブタ膵臓由来  $\alpha$ -アミラーゼを吸着させたアフィニティークロマトを作成した。次に、実施例 4 で得られた活性画分をチャージし、阻害物質のみをカラムに吸着させ、夾雑物質を除いた。更に、溶出液の pH を 3 に下げることによりブタ膵臓由来  $\alpha$ -アミラーゼの立体構造を変化させ、阻害物質との結合力を弱め、阻害物質を溶出した。SDS-PAGE により純度試験を行った結果、分子量約 20,000 の単一タンパクであることが確認された。本操作によって得られたタンパク量は 7 mg で、その IC<sub>50</sub> 値は 1.5  $\mu$ g (タンパク) / ml 反応液、全阻害活性は 1,034 単位であった。

【0048】

【発明の効果】本発明の新規  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質は、安定性、安全性及び有効性に優れ、体内の糖質の供給を抑制するので糖尿病の予防・治療剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

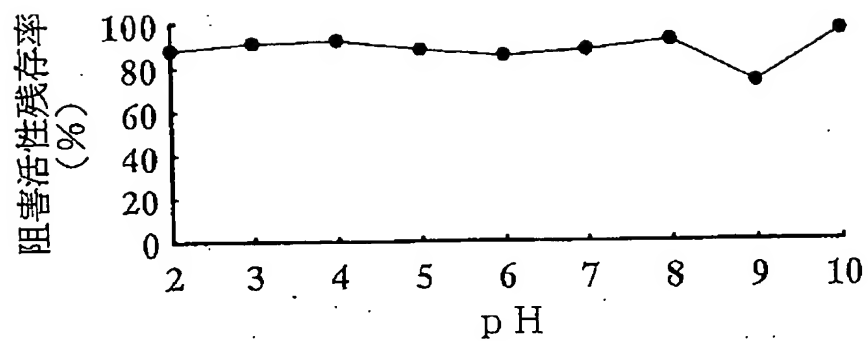
【図 1】本発明の  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質の pH 安定性を示す図である。

【図 2】本発明の  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質の熱安定性を示す図である。

【図 3】本発明の  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害物質の阻害型式を示す図である。

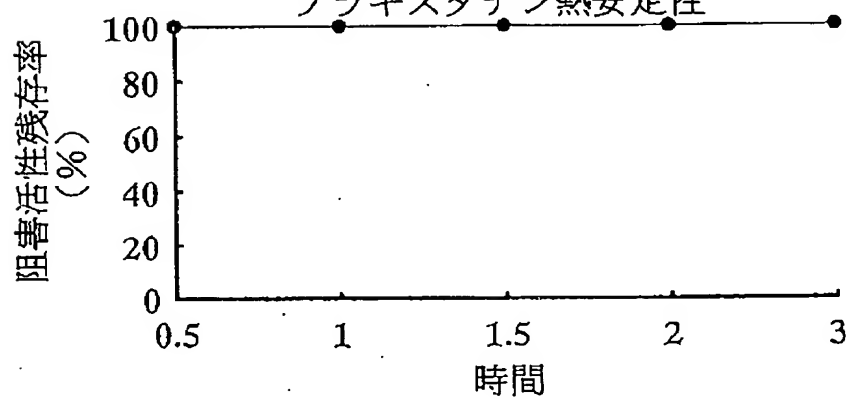
【図1】

## ブラキスタチンpH安定性



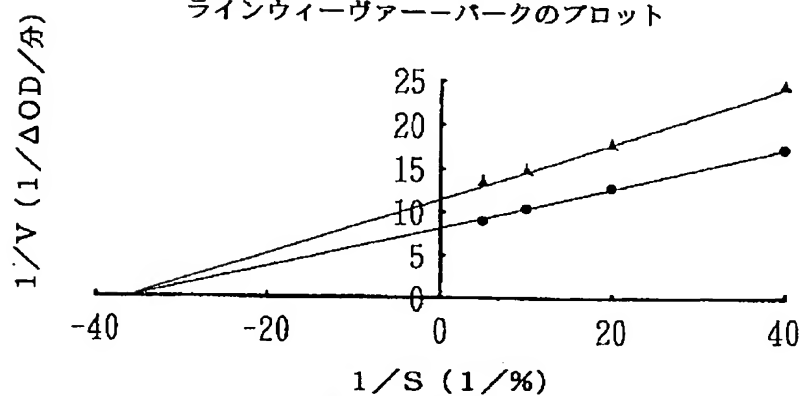
【図2】

## ブラキスタチン熱安定性



【図3】

## ラインウィーヴァーバークのプロット



V: 反応速度 S: 基質濃度



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
. C 1 2 P 1/02		Z 7417-4B		
//(C 1 2 P 1/02				
C 1 2 R 1:645)				

(72) 発明者 横倉 輝男  
東京都港区東新橋 1-1-19 株式会社ヤ  
クルト本社内